

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**(54) PRODUCTION OF FATS AND OILS CONTAINING ARACHIDONIC ACID BY MICROORGANISM**

(11) 2-86789 (A) (43) 27.3.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-237531 (22) 24.9.1988  
 (71) NIPPON OIL & FATS CO LTD (72) MIHOKO KAJI(1)  
 (51) Int. Cl<sup>5</sup>. C12P7/64/(C12P7/64,C12R1/645)

**PURPOSE:** To readily mass produce fats and oils containing a high concentration of arachidonic acid useful as the raw material for medicines, health foods, etc., at an industrially low cost by using mold fungi belonging to Entomophthora.

**CONSTITUTION:** Mold fungi (e.g., ATCC 32890) belonging to Entomophthora genus are cultured in a culture medium containing a organic polybasic acid for accumulation of arachidonic acid in the fungal cells in a high concentration and the cultured fungi are collected, thus obtaining the objective fats and oils.

**(54) PRODUCTION OF TOCOPHEROL**

(11) 2-86790 (A) (43) 27.3.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-239357 (22) 22.9.1988  
 (71) SHOWA DENKO K.K. (72) HAJIME SATO(1)  
 (51) Int. Cl<sup>5</sup>. C12P17/06/(C12P17/06,C12R1/91)

**PURPOSE:** To effectively obtain a large amount of natural tocopherol regardless of seasons without requirement of a vast field for cultivation by tissue culture of a Bryophyta plant and isolation of tocopherol from the cultured material.

**CONSTITUTION:** A Bryophyta plant, preferably such as Marchantia polymorpha L. or Jungermannia amakawana Grolle is inoculated on a synthetic nutrient culture medium and subjected to tissue culture. The resultant cultured material is then subjected to extraction using a solvent such as n-hexane and purification by adsorption chromatography, etc., thus obtaining the objective tocopherol.

**(54) GLIOMA-SPECIFIC ANTIGEN, ANTIBODY AGAINST SAME ANTIGEN AND ASSAY THEREOF USING SAME ANTIBODY**

(11) 2-86791 (A) (43) 27.3.1990 (19) JP  
 (21) Appl. No. 63-239947 (22) 26.9.1988  
 (71) AMANO PHARMACEUT CO LTD (72) JUN YOSHIDA(2)  
 (51) Int. Cl<sup>5</sup>. C12P21/00,C07K15/04,C12N5/16,C12N15/06,C12P21/08,G01N33/574,  
 G01N33/577//A61K39/00,A61K39/395(C12P21/00,C12R1/91)(C12P21/08,C12R1/08)

**PURPOSE:** To enable assay of brain tumor-specific antigen by finding an antibody specific to glioma, isolating the antibody and preparing a monoclonal antibody specific thereto.

**CONSTITUTION:** A monoclonal antibody specific to a glioma-specific antigen which is present in glioma cells, i.e. one kind of human brain tumor cells and absent in normal brain tissue is reacted with humor of an organism. A brain tumor-specific antigen corresponding to the monoclonal antibody specific to the glioma-specific antigen and labeled with a detectable substance and a factor capable of bonding to the monoclonal antibody specific to the glioma-specific antigen and insolubilized on a water-insoluble carrier are added thereto and the resultant mixture is reacted to detect the detectable substance bonded to the water-insoluble carrier.

## ⑫ 公開特許公報(A)

平2-86789

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

C 12 P 7/64  
//C 12 P 7/64  
C 12 R 1:645

識別記号

庁内整理番号

6926-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)3月27日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 微生物によるアラキドン酸含有油脂の製造方法

⑯ 特 願 昭63-237531

⑰ 出 願 昭63(1988)9月24日

⑱ 発 明 者 梶 美 保 子 茨城県つくば市天久保4丁目7番19号  
⑱ 発 明 者 船 田 正 茨城県つくば市梅園2丁目24番5号  
⑲ 出 願 人 日本油脂株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目10番1号  
⑳ 代 理 人 弁理士 舟橋 榮子

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

微生物によるアラキドン酸含有油脂の製造  
方法

## 2. 特許請求の範囲

エントモフトラ属 (*Entomophthora* sp.)糸状  
菌を、有機多塩基酸を添加した培地中で培養す  
ることにより、アラキドン酸を菌体内に高濃度  
で蓄積させ、これを採取することの特徴とする  
アラキドン酸含有油脂の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、生体内で重要な調節因子であるプロ  
スタグランジン類及びロイコトリエン類の前駆体  
として注目されているアラキドン酸を、微生物を  
用い、迅速かつ安価に大量生産させる方法に関す  
るものである。

(従来技術)

通常アラキドン酸は生体内で細胞膜のリン脂質  
のβ位に組み込まれているが、物理的、化学的、

または免疫学的刺激により、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>  
で切り出される。次いで、リボキシゲナーゼ、シ  
クロオキシゲナーゼあるいはプロスタグランジン  
シンターゼにより、順次プロスタグランジン類  
あるいはロイコトリエン類に変換され、各々の生  
理活性を発揮する。

これらプロスタグランジン類及びロイコトリ  
エン類は、現代病として社会問題になっているアレ  
ルギー、ウィルス疾病及び老人性痴呆症などの治  
療薬として大いに期待され、急激に研究が進展し  
ている。従って、プロスタグランジン類及びロイ  
コトリエン類の前駆体であるアラキドン酸は、生  
体に必須なメッセンジャーであり、その重要性は  
測り知れない。

以上のような、生体内で重要な役割を担って  
いるプロスタグランジン類の前駆体であるアラキ  
ドン酸は、生体内では、例えば、肺、脳、心臓及び  
血液もしくは卵黄中に含有されている。ここから、  
抽出し、カラムクロマトグラフィーあるいは、蒸  
留などにより分離精製が試みられた。また、いく

つか全化学合成方法も試みられている。

(発明が解決しようとする課題)

アラキドン酸の含有されている物質は、脂、肺あるいは血液などといった特定部位に存在するのみであり、また、食品中の卵黄中にも含有されているが、いずれも極微量含有されているにすぎない。

しかも、上記の物質では、サンプル収集にきわめて制限を受ける上に、物質自体が非常に腐敗し易く大量生産は困難であった。また、合成においてもアラキドン酸の構造上きわめて困難であるので、いずれも工業的に応用するには至っていないのが現状である。

本発明は、微生物を利用し、アラキドン酸を高濃度含有する油脂を安価に製造する方法を提供することを目的とする。

(課題を解決するための手段)

本発明は、エントモフトラ属 (*Entomophthora* sp.) 糸状菌を、有機多塩基酸を添加した培地中で培養することにより、アラキドン酸を菌体内に高

して用いるが、好ましくは、5～15%が良い。

本発明において、培地中に添加する有機多塩基酸は、例えばクエン酸、イソクエン酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸などがあり、添加量は0.01～1%好ましくは0.3～1%である。他に無基塩として、例えば、硫酸鉄、硫酸マグネシウム、硫酸亜鉛、塩化カリウム、磷酸一カリウム、磷酸二カリウムなどが用いられる。そのほか必要に応じ、微量要素を添加してもよい。

上記糸状菌の培養は、通常、通気攪拌で液体培養が行われる。攪拌速度は、300～900 rpm、通気量は0.5～2 vvmで、通気を充分行う ( $kla = 600 \sim 1000 \text{ hr}^{-1}$ ) ことが必要であり、空気あるいは純酸素を用いてもよい。培養温度は、20～33℃で培養期間は3～7日間である。この時pHは弱酸性がよく、好ましくは5～6に調節する。培養終了後、濾過もしくは遠心分離などで菌体を分離し、十分菌体を洗浄した後、クロロホルム、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ヘキサノール、アセトン及びそれらの混液で菌体から油

濃度で蓄積させ、これを取り出すことを特徴とするアラキドン酸含有油脂の製造方法である。

はえかび属微生物の一種であるエントモフトラ属は、菌体中にアラキドン酸を蓄積することが知られており、このときアラキドン酸は少量蓄積される。

これに対して、本発明は、エントモフトラ属の菌体中に多量のアラキドン酸を含有した油脂を蓄積させるものである。

本発明の使用菌株は、エントモフトラ属のエキスタリス「ATCC 14290、32890」であり、いずれもATCCカタログ(菌株目録)に記載されている糸状菌である。

上記糸状菌は、炭素源として、グルコース、シクロロース、フラクトース、マルトース、グリセリン、蔗糖、澱粉、コーンステープリカー、オリーブ油、やし油など、窒素源として、イーストエキストラクト、ペプトン、肉エキス、大豆粉、脱脂大豆粉、グルテン、ゼラチンなどの有機体窒素中で生育する。この時、炭素源は、3～20%に

脂を抽出する。さらに、フォルチ(Folch)等の分配法などで、粗脂質を分離した後、メチルエステル化し、ガスクロマト付質量分析計(GC-MS)などで分析した。

本発明によれば、例えば、菌体40g/ℓ、脂質16g/ℓで、アラキドン酸は4.8g/ℓ(30%アラキドン酸/総脂質)にも達した。含有脂肪酸は、分枝脂肪酸はまったく含有されておらず、不飽和脂肪酸として、アラキドン酸以外にC<sub>16:1</sub>、C<sub>18:1</sub>が主として含有されていた。

(発明の効果)

本発明によれば、微生物を用いるので、アラキドン酸を高濃度に含有する油脂が容易に得られ、医薬品、健康食品、化粧品などの原料として、工業的に安価にしかも大量に供給することが可能である。

(実施例)

以下実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1

グルコース 5 g、酵母エキス 2.4 g、硫酸鉄 0.05 g、硫酸マグネシウム 0.01 g、塩化カリウム 0.1 g、磷酸一カリウム 0.1 g、コハク酸 0.5 g を 100 ml の脱塩水にとかし、液体培地とした。これを 500 ml 坂口コルベンに仕込み、120℃で、20分間加圧蒸気滅菌し、pH を 5.4 に調節した。あらかじめ、ポテト寒天培地で培養したエントモフトラ・エキスタリス (*Entomophthora exitalis*) A T C C 14290 の胞子のみを殺菌水に懸濁し、これをグルコースを 5 g に変えた前述の液体培地 100 ml 入りの坂口コルベンに植菌し、28℃で 3 日間振盪培養したものを種菌とした。新たに前述の液体培地 100 ml 入りの坂口コルベンにこの種菌を植菌し、28℃で 4 日間振盪培養した。

培養終了後、集菌して、クロロホルム-メタノール (1:2) 系の溶媒で攪拌しながら脂質を 2 回抽出した。抽出液を併せてフォルチの方法で水溶性物質を除き、クロロホルム層を濃縮して総脂質を得た。この時の乾燥菌体量は 30 g/ℓ であり、総脂質量は乾燥菌体の約 30% である 9 g/ℓ であっ

一カリウム 6 g、クエン酸 20 g を 6 ℓ の脱塩水にとかし、液体培地とした。これを 10 ℓ ジャーファーマンターに仕込み、120℃で、20分間加圧蒸気滅菌し、pH を 5.4 に調節した。あらかじめ、ポテト寒天培地で培養したエントモフトラ・エキスタリス (*Entomophthora exitalis*) A T C C 32890 の胞子のみを殺菌水に懸濁し、これを実施例 1 の液体培地 100 ml 入りの坂口コルベンに植菌し、28℃で 3 日間振盪培養したものを種菌とした。新たに前述の液体培地 10 ℓ ジャーファーマンターにこの種菌を植菌し、28℃、600rpm、1vvm で 4 日間培養した。この間グルコース濃度は一定に保ち、最終的には、グルコース濃度は 120 g/ℓ にも達した。

培養終了後、集菌して、ヘキサン及びクロロホルムで脂質を 2 回抽出した。抽出液を併せて濃縮、水洗した後、クロロホルム層を濃縮して総脂質を得た。この時の乾燥菌体量は 40 g/ℓ であり、総脂質量は乾燥菌体の約 35% である 14 g/ℓ であった。この総脂質の一部をとりメタノール-BF<sub>3</sub>を加え、煮沸しながらメチル化して、ガスクロマトグ

ラフで分析した。この総脂質の一部をとりメタノール-BF<sub>3</sub>を加え、メチル化して、ガスクロマトグラフで分析した。その結果、目的とするアラキドン酸は、総脂質量の約 20% 含有されていた。

#### 実施例 2

オリーブ油 6 g、脱脂大豆粉 3.6 g、硫酸鉄 0.05 g、硫酸マグネシウム 0.01 g、塩化カリウム 0.1 g、磷酸一カリウム 0.1 g、イソクエン酸 0.2 g を、50 ml の脱塩水にとかし、液体培地とした。これを 500 ml 坂口コルベンに仕込み、以下実施例 1 に基づいて培養し分析を行った。この時の乾燥菌体は 35 g/ℓ であり、総脂質は乾燥菌体の約 30% である 10.5 g/ℓ であった。この総脂質の一部をとりメタノール-BF<sub>3</sub>を加え、煮沸しながらメチル化して、ガスクロマトグラフで分析した。その結果、目的とするアラキドン酸は、総脂質量の約 30% 含有されていた。

#### 実施例 3

グルコース 300 g、脱脂大豆粉 216 g、硫酸鉄 3 g、硫酸マグネシウム 0.6 g、塩化カリウム 3 g、磷酸

ラフで分析した。その結果、目的とするアラキドン酸は、総脂質量の約 25% 含有されていた。

#### 実施例 4

実施例 3 の中で、回転数を 600 rpm、空気を純酸素に変え、通気量を 1 vvm で 4 日間培養した。

培養終了後、上記の方法で脂質を抽出した。この時の乾燥菌体量は 50 g/ℓ であり、総脂質量は乾燥菌体の約 40% である 20 g/ℓ であった。脂質分析をしたところ、目的とするアラキドン酸は、総脂質量の約 30% 含有されており、空気のみ比べて乾燥菌体、脂質含量及びアラキドン酸生産量が増加した。

#### 実施例 5

実施例 4 の中で、クエン酸を 0.5% に増加して 3 日間培養した。培養終了後、上記の方法で脂質を抽出した。この時の乾燥菌体量は 50 g/ℓ であり、総脂質量は乾燥菌体の約 40% である 20 g/ℓ であった。脂質分析をしたところ、目的とするアラキドン酸は、総脂質量の約 35% 含有されており、菌体の成長が著しく良く、アラキドン酸生産量が増加

した。

#### 比較例

実施例1においてクエン酸を添加せずに同様に行った。このとき得られた乾燥菌体量は25g/lであり、総脂質量は乾燥菌体の約20%である5g/lであった。脂質分析をしたところ、目的とするアラキドン酸総脂質の約15%であり、全体のアラキドン酸収量が著しく低下した。

特許出願人 日本油脂株式会社  
代理人 弁理士 舟橋 榮子

